第 13 卷 第 4 期 昆 虫 学 报 Vol. 13, No. 4
1964 年 7 月 ACTA ENTOMOLOGICA SINICA July, 1964

有机磷杀虫剂使家蝇中毒后对酯酶的抑制作用

謝尊逸 冷欣夫 陈冬蘭 趙玉章
(中国科学院动物研究所)

摘要 本文研究了乐果、敌百虫和 TOCP 等三种葯剂对家蝇胆碱酯酶与脂族酯酶的体内抑制与中毒症状之間的关系。試驗以家蝇为材料，用上述葯剂的 LD_{50} 剂量处理后观察其在不同时間內的中毒症状，并用 Warburg 測压法分别在不同时間內測定家蝇头部和胸腹部胆碱酯酶和脂族酯酶的抑制情况。所得結果表明：无論头部和胸腹部胆碱酯酶的抑制程度都与中毒症状密切相关。当家蝇中毒倒伏时胆碱酯酶的活性最低。脂族酯酶的抑制作用与中毒症状虽有一定的关系，但是单独抑制脂族酯酶不表現出任何症状。因此，可以認为有机磷杀虫剂的主要中毒作用是抑制胆碱酯酶，虽然也可能是两种酶同时受抑制的作用。

一、前 言

有机磷杀虫剂的作用机制普遍都認为是由于它抑制了昆虫体內的胆碱酯酶 (Chadwick & Hill 1947; Metcalf & March 1949; Chamberlain & Hoskins 1951; Metcalf, Fukuto, and March 1958; Smallman, 1958, 1959; Smallman & Fischer 1958; Colhoun 1958, 1959; Stegwee 1960; O'Brien 1961)。然而也有一些人認为除胆碱酯酶以外的其他酯酶在有机磷杀虫剂的中毒过程中起着很重要的作用 (Lord & Potter 1950, 1951, 1954; Potter et al. 1957; Hopf 1952, 1954; Hopf & Tayler 1958; Asperen 1957, 1958, 1960)。Asperen (1958) 用底物保护酶的方法发現，家蝇經 DDVP 处理后中毒击倒时只有 27% 的胆碱酯酶被抑制，而脂族酯酶被抑制达 83%。1960 年 Asperen 又用六种有机磷杀虫剂进行試驗証明了，家蝇在中毒伏倒时，胆碱酯酶的抑制为27—51%，而脂族酯酶的抑制为75—95%。因而他認为脂族酯酶对有机磷杀虫剂的作用机制是具有重要的作用，并認为胸腹部的酯酶是起主要作用的，因为去头的家蝇在中毒后，也出現典型的中毒症状。O'Brien (1961) 也曾指出，Mengle 和 Casida (1960) 发現一些抗胆碱酯酶剂对于正常的与去头的家蝇的 LD_{50} 沒有明显的差异，因而对家蝇头部胆碱酯酶的抑制作用在中毒过程中的重要性是值得怀疑的。

本試驗的目的是以对家蝇有不同毒杀效力的有机磷杀虫剂，在不同的处理时間后分别測定其头部和胸腹部酯酶的抑制情况，以了解其中毒症状与不同酯酶抑制的相互关系，从而进一步闡明有机磷杀虫剂的毒杀作用机制。

二、材料及方法

試驗所用家蝇 (*Musca domestica* L.) 是选用羽化后一天的雌虫，系室內飼养的正常

(本文于 1963 年 12 月 25 日收到)。

品系。

杀虫葯剂　敌百虫系西德拜耳葯厂生产供試验用純化合物；乐果系天津农葯厂生产供試验純品；三邻甲苯基磷酸酯（TOCP）是根据 Rapp（1884）的方法用磷甲酚和三氯氧磷反应制备的，沸点 85℃/3 毫米汞柱，折光率 N_D^{20} 1.4580。

作用底物　氯化乙酰胆碱系德国 E. Merck 出品；三丁酸甘油酯系捷克 Chemapol 出品；乙酸苄酯和丁酸甲酯系上海化学試剂公司生产。

試验时先将家蝇分組，用 Alga 微量注射器将預先测定好的各种葯剂 LD_{50} 剂量的丙酮溶液 1 微升滴加在家蝇腹部末端，分别在 10、20、40、80、160、320、640 及 1280 分鈡时观察記录家蝇中毒症状及死亡虫数；并将家蝇傾入試管內立即置入含冰盐浴的广口保温瓶中（－20℃）冷却，以停止葯剂継續在虫体內进行作用（根据試验結果，在 －20℃ 保存 24 小时与当时进行酶活性的测定所得結果完全一致），并在 24 小时內分别测定家蝇头部及胸腹部酯酶的活性。

酯酶活性的测定是用 Warburg 测压法进行，并用 Asperen（1958）的"保护方法"将組織与冰冷的底物一起在玻璃匀浆器中研磨，然后吸滤除去残渣。吸取 3 毫升放入反应瓶中，通 5% CO_2 及 95% N_2 的混合气体后放在 37℃ 恆温的水浴中平衡 10 分鈡后开始記录，根据 30 分鈡內释放的 CO_2 体积計算抑制百分率。每一处理在不同日期內重复 3 次。

脂族酯酶的活性在高温和碱性溶液中很容易損失（Asperen 1959），所以在测定脂族酯酶的活性时是在 27℃ 中进行，所用底物丁酸甲酯和三丁酸甘油酯是用 0.15 *M* 的氯化鈉溶液配制，在测定时将匀浆液 2.5 毫升放入反应瓶的中央部分，另在側管中加入 0.5 毫升的 0.15 *M* 碳酸氢鈉溶液，通气及在水浴中平衡后，将側管中的碳酸氢鈉溶液傾入反应瓶中与匀浆液混合后开始記录。

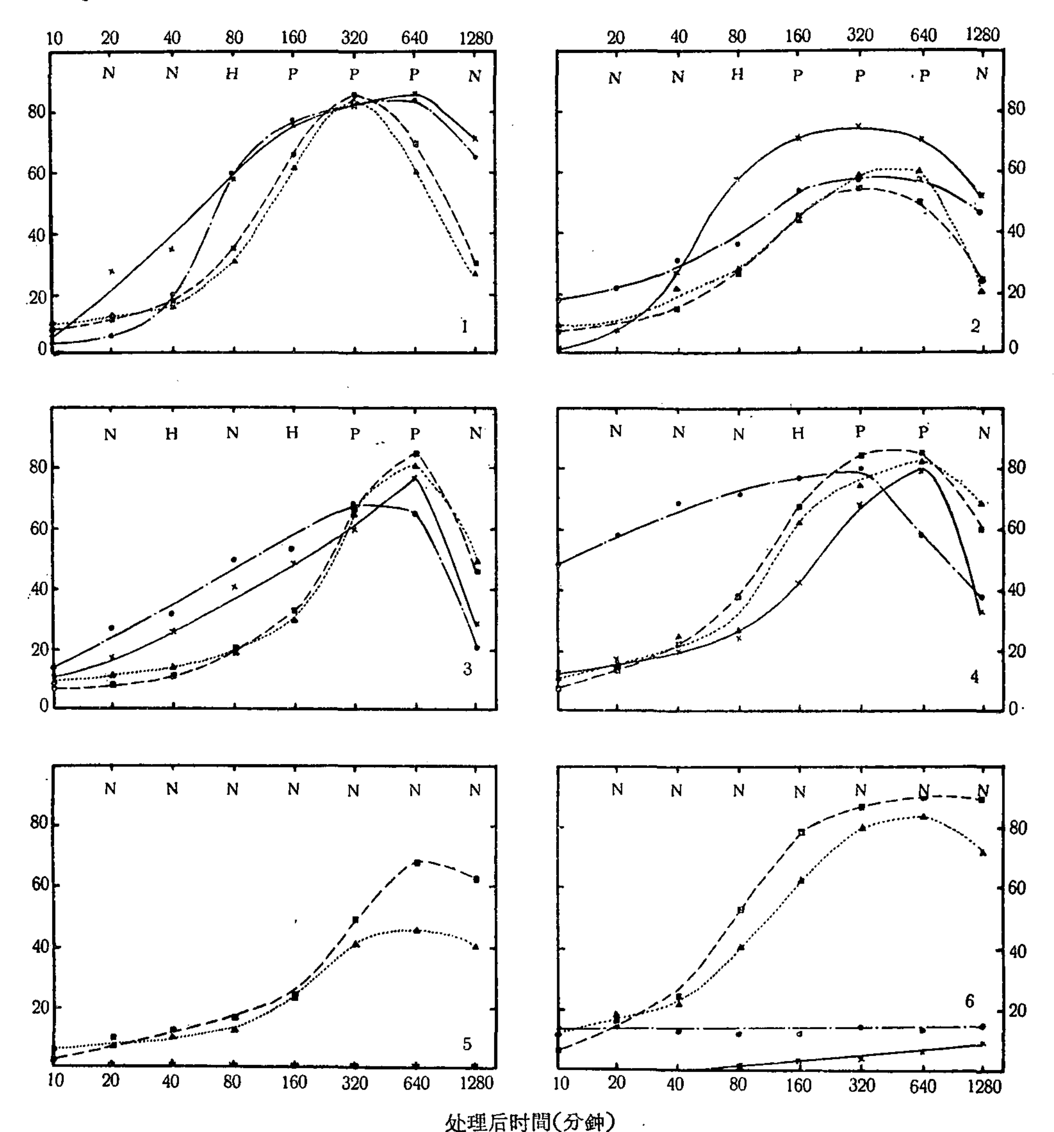
底物氯化乙酰胆碱的最后浓度为 0.01 *M*，直接用碳酸氫鈉緩冲液（$NaHCO_3$ 0.025 *M*；$MgCl_2$ 0.04 *M*；及 NaCl 0.15 *M*）配制。乙酸苄酯、丁酸甲酯和三丁酸甘油酯的浓度均为 0.02 *M*。此三种化合物在配制时加入 1% 的乳化剂（Tween-80）作成乳剂使用。

三、結果与討論

試验所用三种葯剂中，乐果是对家蝇具有高毒效的葯剂，它对家蝇的 LD_{50} 为 0.02 微克/家蝇，家蝇經处理后 80 分鈡就开始出現中毒症状，部分家蝇表現极度兴奋；160 分鈡时有 40% 中毒倒伏，其余仍呈現兴奋状态；320 分鈡时有 74% 倒伏，但是还沒有发現死亡情况；640 分鈡时有 32% 家蝇死亡，48% 是昏迷状态，20% 为正常状态，1280 分鈡时有 56% 死亡，29% 昏迷和 15% 正常。敌百虫对家蝇的毒效比乐果低得多，LD_{50} 为 1.0 微克/家蝇，中毒症状亦比乐果出現的迟緩，160 分鈡才开始有部分家蝇呈現兴奋状态；320 分鈡时只有 30% 倒伏；640 分鈡时有 64% 倒伏，但是还沒有出現死亡情况；1280 分鈡时死亡 47%，27% 呈昏迷状态。TOCP 对家蝇几乎沒有什么毒杀效果，每头家蝇用滴加处理 200 微克的葯量，24 小时后也只有 20% 的死亡。本試验所用的剂量为 100 微克/家蝇，处理后在整个試验期間（1280分鈡內）几乎看不出有什么中毒症状，仅在最后有极少数（約 5%）的家蝇昏迷，但未有发現死亡情况。

各种葯剂对家蝇体內酯酶的抑制作用，在处理 320 分鈡以前的材料，当日进行测定，

640 及 1280 分鈡的材料，次日进行。为了試驗簡便起見，沒有将不同中毒症状的家蝇卽正常、兴奋和昏迷状态的家蝇分别測定。处理后 640 分鈡已有一部分家蝇死亡，而大部分呈現昏迷状态因此全部选用昏迷的家蝇为材料。而 1280 分鈡則选用恢复正常的家蝇作材料进行酶活性的測定。三种葯剂处理后不同时期內头部和胸腹部的体內酯酶抑制情况見下图。



各种葯剂 LD_{50} 剂量处理后家蝇体內酯酶抑制情况。

1.乐果处理后家蝇头部酯酶的抑制；2.乐果处理后家蝇胸腹部酯酶的抑制；3.敌百虫处理后头部酯酶的抑制；4.敌百虫处理后胸腹部酯酶的抑制；5. TOCP 处理后头部酯酶的抑制；6.TOCP 处理后胸腹部酯酶的抑制。

×——× 乙酰胆碱；　—·— 乙酸苄酯；　■----■ 丁酸甲酯；　▲---▲ 三丁酸甘油酯；

征象：N = 正常；H = 兴奋；P = 倒伏。

三种葯剂对家蝇头部和胸腹部不同酯酶抑制程度上虽有差别，但是抑制趋势基本上

是一致的,其中差别比較明显的是在胸腹部乙酸苄酯水解的抑制要比在头部快得多。

从图中可以明显地看出家蝇对有机磷酸酯的中毒症状和家蝇体內胆碱酯酶的抑制作用关系較为密切。乐果对家蝇的毒杀作用速率較快，而对胆碱酯酶的抑制作用曲綫上升也較快。处理后 80 分鈡家蝇呈現兴奋状态时，头部胆碱酯酶的抑制达 60%，胸腹部达 58%。160 分鈡家蝇倒伏时头部抑制达 75%，胸腹部也达 72%。敌百虫对家蝇的毒杀作用速率較乐果要迟緩，而胆碱酯酶的抑制作用曲綫上升也較平坦，80 分鈡时沒有中毒症状产生。头部胆碱酯酶的抑制約 35%，胸腹部約有 25%；160 分鈡开始兴奋阶段,头部抑制达 48%，胸腹部 42%；320 分鈡家蝇倒伏时，头部抑制达 60%，胸腹部 68%。三邻甲苯基磷酸酯对家蝇几乎沒有毒杀效力,同时也看不出有中毒症状,而头部胆碱酯酶完全沒有抑制，胸腹部在整个試驗过程中抑制很低（約 8%）。由此可以看出有机磷杀虫剂对昆虫胆碱酯酶的抑制作用是表明使昆虫中毒的重要因素之一。

乙酸苯酯能被胆碱酯酶和脂族酯酶所水解，而在家蝇整体匀浆液中主要是脂族酯酶水解（Asperen 1959)。根据我們的試驗乙酸苄酯同样也能被胆碱酯酶和脂族酯酶所水解。乙酸苄酯的化学結构和乙酸苯酯相似，只是在乙酸与苯环之間多一个—CH_2—碳鏈。它对胆碱酯酶的亲和力似乎要比乙酸苯酯強,在家蝇整体匀浆液中,用乙酸苄酯作底物加入毒扁豆碱 $10^{-5}M$ 作抑制剂时,酶活性被抑制 85.2%,而以乙酸苯酯作底物毒扁豆碱只抑制活性 33.6%。因而乙酸苄酯恰好与乙酸苯酯相反,主要是由胆碱酯酶所水解。此外从图中可以看出家蝇头部乙酸苄酯的水解抑制曲綫和胆碱酯酶的抑制曲綫趋势是一致的，这可能是由于家蝇体內的胆碱酯酶大部分集中在头部,約占家蝇胆碱酯酶总量的 70%（Asperen, 1959）所致。但在胸腹部乙酸苄酯的水解抑制曲綫和胆碱酯酶的抑制曲綫有明显的差别。抑制水解乙酸苄酯的速率比胆碱酯酶快,特别是在敌百虫处理后 10 分鈡卽有約 50%被抑制。TOCP 亦很明显,在处理后 40 分鈡胆碱酯酶完全沒有抑制,后来也抑制很少,而乙酸苄酯的水解在 10 分鈡时就有 12%被抑制，同时整个試驗期間都保持稳定。头部和胸腹部产生这种差别的原因,可能是由于昆虫胸腹部包括的酶体系比較复杂,其中有胆碱酯酶、脂族酯酶和芳族酯酶等（Metcalf 1956; Asperen 1958 和 Stegwee 1960)，在各种酶体系之間可能存在着互相制約的結果。

丁酸甲酯和三丁酸甘油酯都能被脂族酯酶所水解，然而已經証明脂族酯酶不是单一的一种酶,丁酸甲酯和三丁酸甘油酯显然是由不同的脂族酯酶所水解（O'Brein 1961)。由上图 1—4 中可以看出水解丁酸甲酯和三丁酸甘油酯的脂族酯酶的抑制和家蝇中毒症状之間似乎有一定的关系,随着家蝇中毒程度的加深,脂族酯酶抑制的程度也逐漸加強。然而用 TOCP 处理的家蝇，脂族酯酶亦有很大程度的抑制，如在胸腹部水解丁酸甲酯的酶的抑制甚至高达 89%，而水解三丁酸甘油酯的酶也达 83%，但是却沒有呈現出中毒的症状。这說明虽然家蝇中毒和脂族酯酶的抑制有一定的关系。但脂族酯酶的抑制作用不是有机磷杀虫剂毒杀作用的主要因素。

由上述結果表明家蝇中毒倒伏时，无論在头部或胸腹部胆碱酯酶的抑制程度都比脂族酯酶高,例如用乐果处理后中毒倒伏的家蝇，头部胆碱酯酶被抑制 75%；胸腹为 72%；而脂族酯酶的抑制分别为 65% 及 45%。这与 Asperen (1960)，和 O'Brien (1961)所得結果是不一致的。他們認为有机磷杀虫剂使家蝇中毒倒伏时，脂族酯酶的被抑制常常是

大于胆碱酯酶。此外，在本試驗中測得中毒后家蝇胆碱酯酶的抑制，无論是头部或胸腹部都达到 75—85% 之間，这与 Mengle 和 Casida (1958) 的結果很相似。但 O'Brien (1961) 認为 Mengle 和 Casida 測定的結果是由于未用"保护方法"以致所得的抑制結果偏高，但是 Mengle 和 O'Brien (1960) 曾經試驗証明"保护方法"和一般的"标准方法"所得結果沒有差別，而我們用保护方法也得到与 Mengle 及 Casida 相似的結果。这些事实也說明了有机磷杀虫剂使家蝇中毒倒伏，仍然主要是由于胆碱酯酶被抑制的影响。如果象 O'Brien (1961) 所指出的，可能是由于脂族酯酶被抑制，那么家蝇被 TOCP 处理后头部脂族酯酶被抑制达 67%，胸腹部达 90%，而仍然沒有中毒症状产生这一事实情况，就很难解释。

众所周知，胆碱酯酶和神經传导有不可分割的关系，当胆碱酯酶受到抑制时，神經传导也受到影响 (Nachmanson & Wilson 1951)。Wilson 和 Cohen (1953) 曾經証明当胆碱酯酶被 DFP 抑制达 80% 时，神經传导整个受到阻碍。Colhoun (1959) 曾經发現在昆虫神經系統中梢絡区和非梢絡区都有胆碱酯酶存在，只有在梢絡和肌肉神經交接处的胆碱酯酶才有正常的功能，当測定全部胆碱酯酶的抑制时，包括了起作用的和不起作用的胆碱酯酶，它們的抑制速率是会有差别的，并認为在梢絡区胆碱酯酶的抑制程度比全部胆碱酯酶的抑制程度要高，因而有机磷杀虫剂中毒后的家蝇的胆碱酯酶被抑制程度低于80%，就可以使家蝇中毒倒伏 (Stegwee 1960)。本試驗的結果表明家蝇中毒倒伏时，胆碱酯酶抑制程度，无論是乐果还是敌百虫，或无論是头部还是胸腹部都在 60—75% 之間，因此可以認为乐果和敌百虫使家蝇中毒倒伏，主要是由于胆碱酯酶被抑制所致。

綜上所述的結果，可以初步得出以下的結論：

1) 有机磷杀虫剂使家蝇中毒程度和家蝇体內酯酶的被抑制有正相关。

2) 有机磷杀虫剂使家蝇中毒所产生的倒伏和死亡現象是由于家蝇体內胆碱酯酶和脂族酯酶被抑制所产生的綜合結果，但是其中以胆碱酯酶的被抑制为主要因素。

3) 家蝇体內脂族酯酶的被抑制虽然对家蝇中毒現象有一定的关系，但是仅仅脂族酯酶被抑制，既使抑制高达 90% 也不产生中毒現象。

参　考　文　献

Asperen, K. van 1957. Mode of action and metabolism of some organic phosphorus insecticides in houseflies. Proc. 4th int. Cong. Crop Prot. Hamburg.

———— 1958. Mode of action of organophosphorus insecticides, *Nature*, **18**:355—6.

———— 1959. Distribution and substrate specificity of esterases in the housefly, *Musca domestica* L. *Jour. ins. Physiol.* **3**:306—22.

———— 1960. Toxic action of organophosphorus compounds and esterase inhibition in house flies. *Biochem. Pharmacol.* **3**:136—46.

Chadwick, L. and D. Hill 1947. Inhibition of cholinesterase by diisopropyl fluorophosphates, physostigmine and hexaethyl tetraphosphate in the roach. *Jour. Neurophysiol.* **10**:235—46.

Chamberlain, W. F. & W. M. Hoskins 1951. The inhibition of cholinesterase in the american roach by organic insecticides and related phosphorus-containing compounds. *Jour. econ. Ent.* **44**:177—91.

Colhoun, E. H. 1958. Tetraethyl pyrophosphate and acetylcholine in *Periplaneta americana*. *Science,* **127**: 25.

———— 1959. Physiological events in organophosphorus poisoning. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**: 1127—36.

Hopf, H. S. 1952. Injection experiments on the role of cholinesterase inhibition. *Ann. appl. Biol.* **39**:193—202.

———— 1954. Inhibition of the acetylesterase of the locust nerve cord by some organophosphoric esters. *Ann. appl. Biol.* **41**:248—60.

———— & R. T. Taylor 1958. Role of cholinesterase in insecticidal action. *Nature,* **182**:1381—2.

Lord, K. A. & C. Potter 1950. Mechanism of action of organophosphorus compounds as insecticides. *Nature,* **166**:893.

———— 1951. Studies on the mechanism of insecticidal action of organophosphorus compounds with particular reference of their antiesterase activity. *Ann. appl. Biol.* **38**:495—507.

———— 1954. Differences in esterases from insect species: toxicity of organophosphorus compounds and *in vitro* anti-esterase activity. *Jour. Sci. Food Agric.* **5**:490—98.

Mengle, D. C. & J. E. Casica 1958. Inhibition and recovery of brain cholinesterase activity in house flies poisoned with organophosphate and carbamate compounds. *Jour. econ. Ent.* **51**:750—6.

———— 1960. Biochemical factors in the acquired resistance of house flies to organophosphate insecticides. *Jour. Agric. food Chem.* **8**:431—7.

———— & R. D. O'Brien 1960. The spontaneous and induced recovery of fly-brain cholinesterase after inhibition by organophosphates. *Biochem. Jour.* **75**:201—7.

Metcalf, R. L. & R. B. March 1949. Studies of the mode of action of parathion and its derivatives and their toxicity to insect. *Jour. econ. Ent.* **42**:721—8.

————, M. Maxon, T. R. Fukuto and R. B. March 1956. Aromatic esterase in insects. *Ann. ent. Soc. Amer.* **49**:274—9.

————, T. R. Fukuto, & R. B. March 1958. Mechanisms of action of anticholinesterase insecticides. *Proc. Xth int. Cong. Ent.* **2**:13—9.

Nachmanson, D. & I. Wilson 1951. Cholinesterase. *Advance in Enzymol.* **12**:259—339.

O'Brien, R. D. 1961. Esterase inhibition in organophosphorus poisoning of house flies. *Jour. econ. Ent.* **54**:1161—4.

Potter, C., K. A. Lord, J. Kenten, E. H. Salkeld & D. V. Holbrook 1957. Embryonic development and esterase activity of eggs of *Pieris brassicae* in relation to TEPP-poisoning. *Ann. appl. Biol.* **45**:361—75.

Rapp, M. 1884. Ueber die Phenyl- und Kresylester der Phosphorsäure und ihre Nitrirung. *Ann. Chem. Liebig,* **224**:156—78.

Smallman, B. N. 1958. The physiological basis for the mode of action of organophosphorus insecticidés. *Proc. Xth int. Cong. Ent.* **2**:5—12.

———— 1959. Enzyme relationships in the action of organophosphorus insecticides. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**:1123—6.

———— & R. W. Fisher 1958. The effect of anticholinesterases on acetylcholine levels in insects. *Can. J. Biochem. Physiol.* **36**:575—83.

Stegwee, D. 1960. The role of esterase inhibition in tetraethylpyrophosphate poisoning in the housefly, *Musca domestica* L. *Can. J. Biochem. Physiol.* **38**:1714—830.

Wilson, I. B. & M. Cohen 1953. The essentiality of acetylcholinesterase in conduction. *Biochim. et Biophys. Acta,* **11**:147—56.

ESTERASE INHIBITION OF HOUSE-FLY POISONING BY ORGANOPHOSPHORUS INSECTICIDES

SHIEH TZENG-YIH, LENG HSIN-FU, CHEN DUNG-LIAN & CHAO YU-CHANG
(Institute of Zoology, Academia Sinica)

The present paper is a study of the correlation between esterase inhibition and house-fly poisoning by Rogor, Dipterex and TOCP (tri-o-cresyl phosphate). One-day-old house-flies were used as testing material. After treatment by topical application with the LD_{50} doses of these insecticides to the tip of the abdomen, the symptoms of the house-flies were observed and the in vivo inhibitions of cholinesterase and ali-esterase within fly-heads and trunks were determined by Warburg method. The substrate protection technique was employed.

The results showed that the inhibition of cholinesterase, whether in fly-heads or in trunks, was closely related to the symptoms induced by these toxicants and the activity of cholinesterase reached to the minimum after the flies were knocked down. The inhibition of ali-esterase was also related to the symptoms but symptoms did not appear when ali-esterase alone was inhibited (even to the extent of 90%). For the present it seems justifiable to conclude that the major toxic action of organophosphorus insecticides is the inhibition of cholinesterase, though it is quite possible that the toxic action might be due to joint inhibition of both cholinesterase and ali-esterase.